

VENTRAALISEN JA DORSAALISEN STRIATUMIN DOPAMIINI D2 RESEPTORIEN MERKITYS NEUROPAATTISEN SENSORIS- DISKRIMINATIIVISEN JA AFFEKTIIVIS-MOTIVATIONAALISEN KIVUN SÄÄTELYSSÄ

Tuure Ärling
Lääketieteen kandidaatti
Biolääketieteen laitos, fysiologian osasto

Tutkielma
Ohjaaja: Prof. Antti Pertovaara
Helsingin yliopisto, lääketieteellinen tiedekunta

tuure.arling@helsinki.fi

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Lääketieteellinen, Helsingin yliopisto		Biolääketieteen laitos, fysiologian osasto	
Tekijä – Författare – Author			
Tuure Ärling			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Ventraalisen ja dorsaalisen striatumin dopamiini D2 reseptorien merkitys neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen ja affektiivis-motivationaleen kivun säätelyssä			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Työn laji – Arbetets art – Level		Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Tutkielma		2.4.2010	24
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Aivojen tyvitumakkeilla on tärkeä merkitys kipuinformaation säätelyssä. Useat eri mekanismit ovat säätelyn takana. Yhä enemmän on saatu näyttää dopaminergisen tiedonvälityksen merkityksestä kipuinformaation käsittelyssä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää ja vertailla ventraaliseen striatumin accumbens tumakkeen ja dorsaalisen striatumin dopamiini D2 reseptorien vaikutusta neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen- ja affektiivis-motivationaleen kivun säätelyssä. Dopamiini D2 reseptorien stimuloitiin käytettiin quinpirolea, kontrolliaineena fysiologista keittosuolaliuosta. Neuropatia saatiin koe-eläimille aikaan SNI-mallia käyttäen. Sensoris-diskriminatiivista kipua tutkittiin ärsyttämällä koe-eläimen raajaa monofilamentilla, affektiivis-motivationaleen komponentin tutkimisessa käytettiin hyväksi käyttäytymiseen ja ehdollistumiseen perustuva tutkimusmenetelmä. Lisäksi tutkittiin accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaation vaikutusta RVM:n pronosiseptiivisten ON-solujen toimintaan elektrofysiologisilla rekisteröimismenetelmillä. Accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaatiolla ei havaittu olevan vaikutusta neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen- eikä affektiivis-motivationaleen kivun säätelyssä kontrolliaineena käytettyyn fysiologiseen keittosuolaliuokseen verrattuna. Näiden tulosten kanssa linjassa oli myös se, että myös RVM:n pronosiseptiivisten solujen toimintaan accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaatiolla ei ollut vaikutusta. Sen sijaan dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaation havaittiin lieventävän affektiivis-motivationaleen kipua, jo aiemmin tiedettiin dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaation vaikuttavan lieventäen neuropaattiseen sensoris-diskriminatiiviseen kipuun. Tulos vahvistaa dorsaalisen striatumin D2 reseptorien merkitystä neuropaattisen kivun säätelyssä. Lisäksi accumbens tumaketta käsittelevät tulokset ovat linjassa aiempien tutkimustulosten kanssa, joiden mukaan neuropatia aiheuttaa muutoksia VTA:n ja accumbens tumakkeen välisessä dopaminergisessä tiedonvälityksessä ja kivun säätelyssä verrattuna tilanteeseen ilman neuropatiaa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Neuropatia, dopamiini D2 reseptorit, ventraalinen – ja dorsaalinen striatum, accumbens tumake			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO.....	1
2 AINEISTO.....	5
3 MENETELMÄT.....	5
4 TULOKSET.....	8
5 POHDINTA.....	10
6 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	13
7 KUVAT JA KUVAAJAT.....	14
8 VIITTEET.....	20

1 Johdanto

Kivun tunteminen on elintärkeää, sillä se varoittaa kudosta uhkaavasta tekijästä ja kudostuhosta. Kivun tunteminen on siis normaalisti täysin fysiologinen ja ohimenevä ilmiö, mutta toisaalta kipu voi olla myöskin patologista ja tarkoituksetonta. Kipu on hyvin epämiellyttävää, se hallitsee elämää ja huonontaa sen laatua. Yleisesti kipu jaetaan etiologiansa mukaan neuropaattiseen - ja inflammatoriseen kipuun, se on seurausta hermo- tai kudosaivuriosta. Lisäksi itse kipu jakautuu vielä sensoris-diskriminatiiviseen – ja affektiivis-motivationaaliseen komponenttiin. Kivun synnyttämiseen osallistuvat mekanismit sekä ääreishermostossa että keskushermostossa. Ääreishemoston kipureseptorit eli nosiseptorit ovat keskeisessä asemassa kipuinformaation tuottamisessa, tavallisesti niitä aktivoivia ärsykeitä ovat voimakkaat mekaaniset ärsykkeet, ääriämpötilat, hapenpuute ja erilaiset kemialliset aineet. Kipureseptorien aktivaatio perustuu monimutkaiseen farmakologiaan, jossa useat eri kemikaalit, peptidit, prostaglandiinit, leukotrieenit ym välittäjäaineet osallistuvat kipureseptoreiden aktivoimiseen joko suoraan, herkistämällä niitä tai edesauttamalla muiden aineiden vaikutusta. Nosiseptorit ovat kipuradan ensimmäisiä neuroneja, joiden soomat sijaitsevat selkäydinhermon takajuuren gangliossa tai aivohermotumakkeissa, ne ovat puolestaan synaptisessa yhteydessä kipuradan toisiin neuroneihin, joiden soomat sijaitsevat selkäytimen takasarvessa tai aivorungossa. Kivun sentraalinen prosessointi alkaa siis kipuradan toisissa neuroneissa, jotka ovat synaptisessa yhteydessä myös lukuisiin muihin neuroneihin, nämä muut neuronit saattavat estää kipuinformaation etenemistä, mihin perustuukin ns. porttiteoria(1). Kipuradan toisesta neuronista kipuinformatio kulkee keskushermoston ylempiin osiin lukuisia eri reittejä, kuten spinotalaamista, spinomesenkefaalista, spinoretikulaarista, spinolimbista, spinokervikotalaamisia tai postsynaptista dorsaalisen pylvään rataa pitkin. Näitä ratoja pitkin kipuinformatio kulkee lukuisiin eri paikkoihin aivoissa, joista keskeisin on talamus, mutta myös limbisen järjestelmän ja aivorungon eri osat. Aivoissa sijaitsevat myöskin laskevien kipuratojen lähtökohdat, joista tärkeimpiä ovat hypothalamus ja sen eri osat, parabrachiaalinen tumake, nucleus tractus solitarius, aivorunko ja erityisesti sen Raphen tumake (NRM) ja rostroventromediaalinen ydinjatkos (RVM), dorsaalinen verkkotumake, isoavokuori sekä keskiaivoharmaa (PAG) (2). Laskevat kipuradat osallistuvat kipuinformaation inhibointiin ja fasilitointiin lukuisilla eri mekanismeilla ja välittäjäaineilla (2). Niillä on myös taipumus muokkaantua ajan kuluessa(3). (4)(5)

Neuropaattisen kivun aiheuttaa useimmiten ääreishermostossa oleva patologinen tila, kuten hermovaurio. Tällöin puhutaan perifeerisestä neuropatiasta. Perifeerisen hermovaurion aiheuttama neuropaattinen kipu on seurausta sähkökemiallisen ympäristön muutoksista hermopäätteiden ympäristössä(6,7). Neuropaattisen

kivun ylläpitoon vaikuttavat myös muutokset kipua säätelevissä laskevissa hermoradoissa, joiden tärkeimpiä lähtökohtia ovat keskiaivoharmaa (PAG) , Raphen tumake ja limbisen järjestelmän eri osat (3,5,8,9). Perifeerinen neuropaattinen kipu voi olla ärsykkeestä riippumaton tai ärsykkeen aiheuttama ja sen oireita ovat mm. erilaiset tuntohäiriöt, hyperalgesia ja allodynia. Hyperalgesialla tarkoitetaan tilaa, jossa kivulias ärsyke tuntuu poikkeuksellisen kivuliaalta. Allodynialla tarkoitetaan puolestaan sitä, että normaalisti kivuton ärsyke tuntuu kivuliaalta. Toisaalta neuropaattinen kipu voi olla myös seurausta patologisesta tilasta selkäydinhermon juurissa (radiculopaattinen kipu) tai keskushermostossa. Kaiken kaikkiaan neuropaattisen kivun etiologian, mekanismien ja oireiden suhde on hyvin monimutkainen ja ajan kuluessa muuntuva, mikä tekee tehokkaan hoidon kehittämisen erittäin vaikeaksi. Tavanomaisten kipulääkkeiden, tulehduskipulääkkeiden ja opioidien, teho on ollut huono tai mitätön neuropaattisen kivun hoidossa ja niinpä farmakologisella lääkityksellä onkin pyritty vaikuttamaan lähinnä kivusta johtuviin psykologisiin oireisiin. Vaikka neuropaattisen kivun mekanismeja tunnetaan yhä paremmin, niin toistaiseksi tietämys ei ole ollut riittävää tehokkaan hoidon löytämiseksi ja niinpä näiden mekanismien selvittämisen on jatkuttava, jotta neuropaattisesta kivusta kärsiviä kyettäisiin auttamaan paremmin. (6)

Kivun farmakologinen lievittäminen on perinteisesti nojannut tavanomaisiin kipulääkkeisiin, tulehduskipulääkkeisiin ja opioideihin sekä neuropaattisen kivun kohdalla myös mm. masennus- ja epilepsialääkkeisiin. Toisaalta yhä enemmän on saatu näyttöä keskushermoston dopaminergisten järjestelmien merkityksestä kipuinformaation synnyssä ja moduloinnissa (10). Dopamiini kuuluu katekoliamiineihin, jonka synteesin kannalta keskeinen aminohappo on L-tyrosiini, joka muokataan aluksi L-dopamiiniksi ja tämä edelleen dopamiiniksi. Dopamiinin metabolian ja kuljetuksen kannalta tärkeitä komponentteja ovat monoamiinioksidaasit (MAO), katekoli-o-metyyli transferaasi (COMT) sekä solukalvojen dopamiinitransportteri (DAT). Dopamiinireseptorit jakautuvat viiteen alatyyppiin, D1-D5. D1 ja D5 reseptorit kuuluvat D1 reseptoriperheeseen ja D2, D3 sekä D4 reseptorit D2 reseptoriperheeseen. Dopamiinireseptorit voivat olla sekä postsynaptisia että presynaptisia autoreseptoreja. Tärkeimpiä dopaminergisten hermoratojen lähtökohtia ovat substantia nigra, VTA ja talamus, joista dopaminergiset neuronit projisoivat useisiin aivojen osiin muodostaen nigrostriataalisia, mesolimbisia ja tuberoinfundibulaarisia ratoja (10). On osoitettu, että dopaminergiset solut jakautuvat toonisiin ja faasisiin soluihin (11,12). Toonisesti toimivat solut vapauttavat dopamiinia sykleittäin, mutta tällä tavalla vapautuva dopamiini ei tavallisesti aktivoi postsynaptisia D2 reseptoreita vaan presynaptisia autoreseptoreja. Sen sijaan faasisesti toimivat dopaminergiset neuronit vapauttavat ärsykkeen seurauksena suuria määriä dopamiinia, joka aktivoi postsynaptisia D2 reseptoreja. COMT metaboloii toonisesti vapautuvaa dopamiinia ja DAT poistaa faasisesti vapautuneen dopamiinin ekstrasellulaaritalasta (13). Geneettinen variaatio COMT aktiivisuudessa(14) näyttäisi vaikuttavan kipuinformaation käsittelyyn. Alhainen COMT aktiivisuus alentaa

sensoris-diskriminatiivista kipukynnystä ja pahentaa affektiivis-motivatiivista kipua (15). Kroonisen kivun kehittyminen on todennäköisempää alhaisen COMT-aktiivisuuden omaavilla yksilöillä (16). (10,17)

Aivojen basaali- ja limbisillä alueilla on lukuisia motorisiin, kognitiivisiin ja sensorisiin toimintoihin liittyviä tehtäviä. Yhä ilmeisemmäksi käy myös se tosiasia, että basaali- ja limbisillä alueilla näyttäisi olevan tärkeä merkitys nosiseptiivisen informaation säätelyssä (14). Sekä dorsaalisen striatum ja ventraalisen striatum on havaittu lukuisissa tutkimuksissa olevan tärkeässä roolissa kipulinfrakation muokkaamisessa, mitä aihetta on käsitelty mm. seuraavissa artikkeleissa (18-20).

Dorsaalisen striatum merkityksestä erilaisten kiputyypin modulaatiossa on saatu selkeää näyttöä niin suorissa eläinkokeissa (21) kuin myös epäsuorissa, ihmisillä suoritetuissa kokeissa (14,22,23). Striatum kipua säätelevä vaikutus välittyy ainakin osittain spinaalitasolle(21) edellä mainittujen tumakkeiden kautta. Erityisesti dorsaalisen striatum dopaminergisen järjestelmän D2 reseptorit näyttäisivät olevan tärkeässä osassa erilaisten kiputyypin modulaatiossa(20,24,25). Päätelmiä tukevat havainnot, jotka osoittavat, että kipuarisot aiheuttavat striatum hermosolujen, erityisesti nigrostriataalisen dopaminergisten hermosolujen, aktivaation(26-28). Lisäksi eläinkokeissa on osoitettu, että nigrostriataalisiin neuroneihin kohdistuvat leesiot voimistavat kipua(29-31), tähän liittyviä käytännössä havaittuja esimerkkejä ovat lisääntynyt kivun tunto Parkinsonin taudin ja suukipuoireyhtymän, BMS, yhteydessä(32,33).

Ventraalisen striatumin makroalalla tumakkeella eli accumbens tumakkeella on keskeinen merkitys aivojen palkitsemistoimintojen kannalta(34). Palkitsemistoimintojen lisäksi accumbens tumakkeella yhdessä ventraalisen tegmentum alueen, VTA:n, kanssa näyttäisi olevan tärkeä merkitys myös nosiseptiivisen informaation käsittelyssä ja säätelyssä, mikä on osoitettu eri välittäjäaineiden, kuten dopamiinin ja nikotiinin avulla, mutta täyttä selvyyttä näiden eri tumakkeiden välisen toimintojen vuorovaikutuksista nosiseptiivisen informaation säätelyssä ei ole. (18,35-41) Anatomisesti accumbens tumake jakautuu kuoreen (shell) ja ytimeen (core), joista etenkin kuorella näyttäisi olevan merkitystä nosiseptiivisen informaation säätelyssä (42). Toisaalta kuori näyttäisi säätelevän ytimen toimintaa ja onkin arvioitu, että ydin osallistuisi enemmän pitkäkestoisen nosiseption ylläpitoon ja kuori puolestaan lyhytaikaiseen kivun säätelyyn (43).

Dopaminergisen tiedonvälityksen on havaittu olevan tärkeässä merkityksessä analgesian kannalta. Niinpä esimerkiksi endogeenisten opioidien analgeettisen vaikutuksen uskotaan välittyvän ainakin dopaminergisen järjestelmän välityksellä(40). Lisäksi kipuarisot on havaittu lisäävän dopamiinin vapautumista accumbens tumakkeeseen (44). Toisaalta on esitetty näiden havaintojen kanssa ristiriidassa olevaa tietoa; on saatu viitteitä siitä, että kipustimulaation aktivoimat neuronit VTA:ssa eivät olisikaan itseasiassa

dopaminergisia(45). Lisäksi on havaittu, että accumbens tumakkeen dopamiinilla on keskeinen merkitys amfetamiinin aiheuttamassa analgesiassa, mutta ei morfiinin aiheuttamassa analgesiassa(46), mikä ei sopisi yhteen sen kanssa, että opioidien aiheuttama analgesia välittyisi accumbens tumakkeen dopamiinin välityksellä. Eläinkokeissa on osoitettu, että accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimuloiminen lievittää inflammatorista kipua(47). Accumbens tumakkeen D2 reseptorien vaikutuksesta neuropaattisen kivun säätelyyn ei puolestaan ole tietoa. On kuitenkin havaittu, että neuropatian kehittyminen vähentää dopamiinin vapautumista accumbens tumakkeeseen mahdollisesti VTA:n vähentyneen μ -opioidi reseptorien aktiivisuuden vuoksi(48,49), mitä tukisi edelleen havainto siitä, että selektiivisesti μ -opioidi reseptoreja salpaava aine vähentää dopamiinimetaboliaa aivoissa (50). Lisäksi neuropatian on havaittu aiheuttavan VTA:ssa molekulaarisia muutoksia, joiden seurauksena opioidien palkitsemistoimintoihin liittyvät vaikutukset vähenevät(51). Kaiken kaikkiaan VTA:n ja accumbens tumakkeen välisen dopaminergisen tiedonvälityksen merkitys analgesian kannalta näyttäisi olevan lukuisista tutkimustuloksista huolimatta edelleen hyvin epäselvää, vaikkakin karttunut tieto ainakin tähän päivään mennessä näyttäisi enemmän puoltavan dopamiinin tärkeää merkitystä kivun säätelyssä.

Kipukynnysmäärittämisellä on kyetty osoittamaan se, että dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulointi lievittää neuropaattista sensoris-diskriminatiivista kipua (25), mikä sopisi hyvin yhteen sen kanssa, että dorsaalisen striatumin ja sensorisen informaation käsittelyn kannalta oleellisen isoavokorteksin välillä on runsaasti hermoyhteyksiä (52,53). Dorsaalisen striatumin merkityksestä neuropaattisen kivun affektiivis-motivationaleen komponenttiin ei vielä ole tietoa. Koska limbiseen järjestelmään kuuluvan ventraalisen striatumin accumbens tumakkeen tiedetään olevan tärkeässä osassa aivojen palkitsemisjärjestelmän, emootioiden ja motivaation kannalta(34), ja koska ihmisillä suoritetuissa kokeissa on saatu viiteitä ventraalisen striatumin vaikutuksesta affektiivis-motivationaleen kivun säätelyyn(23), mitä eläimillä suoritettut kokeet tukevat(39,40,54,55), niin esitämmekin hypoteesin, että accumbens tumakkeen D2 reseptorit osallistuvat ensisijaisesti neuropaattisen kivun affektiivis-motivationaleen komponentin säätelyyn. Tätä asiaa pyrimme mallintamaan käyttäytymisen ja ehdollistamisen avulla käyttäen LaBudon ja Fuchsin kehittämää testiä, jossa koe-eläin oppii välttämään paikkaa, jossa sille tuotetaan kipua(56). Lisäksi pyrimme selvittämään kipukynnysmäärittämisellä accumbens tumakkeen D2 reseptorien merkityksen neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen kivun säätelyyn sekä dorsaalisen striatumin D2 reseptorien merkityksen neuropaattiseen affektiivis-motivationaleen kivun säätelyyn.

2 Aineisto

Kokeissa käytetyt eläimet olivat aikuisia, 200-300 g:n painoisia Hannover-Wistar (Harlan, Horst, Hollanti) urosrottia. Näille kokeille on Etelä-Suomen lääninhallituksen myöntämä eläinkoelupa (ESLH-2007-09352/Ym-23). Rottia säilytettiin huoneessa, jossa valaistus oli säädetty siten, että 12 tuntia oli yhtäjaksoisesti valoisaa ja 12 tuntia yhtäjaksoisesti pimeää. Rottien elämää häkeissä ei rajoitettu lainkaan ja niillä oli jatkuvasti mahdollisuus juoda ja syödä. Ennen hermovaurion tekemistä ja kanyylin asettamista rotat olivat neljän hengen ryhmissä yhteisessä häkissä, suoritettujen operaatioiden jälkeen kukin erillisissä häkeissään. Stressianalgesian ja muiden häiriötekijöiden minimoimiseksi rottien annettiin totuttautua koeympäristöön ja käsittelyyn 3-6 päivän ajan ennen varsinaisten testien aloittamista.

3 Menetelmät

Neuropatian aikaansaamiseksi rotille tehtiin kirurgisesti hermovaurio SNI- mallin (spared nerve injury model) mukaisesti(57). Ennen kirurgisen toimenpiteen suorittamista rotat nukutettiin sodiumpentobarbitaalilla (Mebumat®, OrionPharma, Espoo, Finland), joka annosteltiin intraperitoneaalisesti annoksella 60 mg/kg. Kirurgisessa toimenpiteessä tehtiin aluksi ihoviilto vasemman reiden lateraalipinnalle. Tämän jälkeen leikkattiin auki kaksipäinen reisilihas, m.biceps femoris, jolloin päästiin käsiksi lonkkahermoon, n. ischiadicus, ja sen kolmeen päätehaaraan: n. peroneus communis, n. suralis ja n. tibialis. Hermot eroteltiin varovaisesti toisistaan, minkä jälkeen n. peroneus communikseen ja n. tibialikseen tehtiin ligaatiot 3-0 silkkilangalla. N. peroneus communis ja n. tibialis katkaistiin ligaatiokohdan distaalipuolelta, 3-4 mm n. ischiadicuksen haarautumiskohdasta distaalisuuntaan samalla varoen vaurioittamasta n. suralista. Suoritettujen toimenpiteiden jälkeen lihas, m. biceps femoris, ja ihoviilto ommeltiin erikseen kiinni. Tehdyn hermovaurion seurauksena neuropatia kehittyi vasemman n. suraliksien hermotusalueelle jalkaterän lateraalipuolelle, kuva 1(57).

Testiaineiden annostelun mahdollistamiseksi kullekin rotalle asennettiin ruostumaton 26-kaliiperinen ohjainkanyyli ventraalisen striatumin accumbens tumakkeeseen (AP: 11 mm, ML: 1 mm, DV: 7,5 mm; Paxinos and Watson 2nd edition 1986) ja dorsaaliseen striatumiin (AP: 8,7 mm, ML: +4,2 mm, DV: -4,0 mm; Paxinos and Watson 2nd edition 1986), rotat olivat nukutettuna ja asetettuna stereotaksiseen laitteeseen. Kanyylit asetettiin ipsilateraalisesti vaurioitettuun takaraajaan nähden, eli vasempaan accumbens tumakkeeseen. Kanyyliin kiinnitys kalloluuhun tehtiin ruuvien ja hammassementin avulla. Kanyyliin

tukkeutumisen estämiseksi niihin asennettiin suoja, joka irrotettiin aineiden annostelemisen ajaksi. Itse annostelu suoritettiin 10 µl:n Hamilton-mikroruiskulla. Ruisku yhdistettiin 33-kaliiperiseen mikroinjektioneulaan 30-40 cm:n pituisella, ulkohalkaisijaltaan 0.61 mm:llä, myrkyttömällä polyeteeniletkulla (PE-10, Becton Dickinson & Co. USA). Aineet annosteltiin kohteisiinsa 0.5 µl:n mikroinjektioina siten, että 33-kaliiperinen mikroinjektioneula asetettiin kanyyliin niin, että injektioneulan pää tuli yhden 1 mm:n ulos kanyylistä. Injektion jälkeen mikroinjektioneulan annettiin olla kanyylissä noin 30 sekunnin ajan takaisinvirtauksen estämiseksi, ennen kuin se vedettiin ulos.

Ennen testejä eläinten annettiin tottua testiympäristöön 4-7 päivän ajan. Testit suoritettiin 9-30 vuorokauden jälkeen hermovaurion tekemisestä. Ennen jokaista testiä eläinten annettiin totuttautua omassa häkissään testiympäristöön noin 30 minuutin ajan. Testiaineen annettiin vaikuttaa 15 minuuttia ennen testien aloittamista. Yksittäisiä testejä ei suoritettu yhdellä eläimellä peräkkäisinä päivinä, vaan testien välissä oli vähintään yksi kokonainen vuorokausi. Kun affektiivis-motivationaleen kipuun ja sensoris-diskriminatiiviseen kipuun liittyvät testit olivat saatettu päätökseen, niin jokaiselle eläimelle tehtiin vielä elektrofysiologisia mittauksia. Kukin eläin lopetetettiin välittömästi elektrofysiologisten testien päätteeksi suurella i.p. sodiumpentobarbitaali-infuusiolla. Kaikkien eläinten aivot säilöttiin testien päätyttyä formaaliiniin, jossa aivot fiksoituvat niin, että niistä voitiin tehdä mikroleikkeitä. Histologiset mikroleikkeet värjättiin formol-Thioniinilla(58) ja niistä voitiin vahvistaa kanyylin ja mikroelektrodin olleen halutussa kohteessa.

Kivun affektiivis-motivationaleista komponenttia testattiin käyttäytymisen ja ehdollistumisen avulla käyttäen hyväksi LaBudun ja Fuchsin kehittämää menetelmää(56) lievästi muunneltuna. Eläimet, yksi kerrallaan, laitettiin metalliverkon päällä olevan, pohjasta avoimen, 30x30x30cm suuruisen muovilaatikon sisälle. Muovilaatikon toinen puoli oli läpinäkyvä, valoisa puoli, ja toinen puoli mustalla teipillä peitetty, pimeä puoli. Kun eläinten oli annettu tottua testiympäristöön, niin ne siirrettiin muovilaatikkoon 30 minuutiksi, jonka aikana ne saivat kulkea laatikossa vapaasti ilman kipuärsykettä. Viiden minuutin välein rekisteröitiin aika, jonka ne viettivät pimeällä puolella, myös pimeässä vietetty kumulatiivinen aika rekisteröitiin. Tämän jälkeen testattiin eri häkissä mekaanisen kipuärsyksen kynnysarvoa, tästä myöhemmin. Seuraavaksi eläimelle annettiin testiaine, jonka annettiin vaikuttaa 15 minuutin ajan. Vaikutusajan jälkeen eläin siirrettiin jälleen muovilaatikkoon, mutta nyt sitä alettiin ärsyttää jatkuvasti n. suraloksen hermotusalueelle jalkaterän lateraalipinnalle kipua tuottavalla von Freyn monofilamentilla (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA, USA), jonka voimakkuus vaihteli 60-180 g:aan. Tämä ärsyke on riittävän voimakas aktivoimaan kudostuhoa aistivat ääreishermpäätteet eli nosiseptorit. Kun eläin oli pimeällä puolella ärsytys kohdistui vasempaan

jalkaan, jossa oli perifeerinen neuropatia. Vastaavasti valoisalla puolella ollessaan ärsytettiin vaurioittamatonta jalkaterää. Myös pimeällä puolella ärsytettiin vaurioittamatonta jalkaa aina, kun eläin piti vaurioitettua jalkaa ylhäällä niin, että sitä ei saatu ärsytettyä, vaurioittamattoman jalan ärsytys lopetettiin välittömästi eläimen laskettua vaurioitetun jalan. Jälleen rekisteröitiin viiden minuutin välein aika, jonka rotta vietti pimeällä puolella, sekä kumulatiivinen aika.

Kivun sensoris-diskriminatiivisen komponentin testaus tapahtui kipukynnysmäärittäyksillä. Eläimet laitettiin metalliverkon päällä olevaan pieneen muovilaatikkoon. Kipukynnys määriteltiin käyttämällä hyväksi von Freyn monofilamentteja (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA, USA), joiden voimakkuudet vastasivat 1.4, 2.0, 6.0, 10.0 ja 15.0 g:n massaa. Kipukynnykset rekisteröitiin sekä vaurioitetusta – että vaurioittamattomasta jalasta. Varsinaisesti kipukynnyksen määrittäminen tapahtui siten, että kullakin monofilamentilla ärsytettiin jalkaterän lateraalipintaa viidesti ja ylös kirjattiin aina prosentuaalinen osuus niistä ärsykeistä, jotka aiheuttivat vetäytymisvasteen. Mikäli monofilamentti aiheutti vetäytymisheijasteen joka kerta, tuli tulokseksi tämän monofilamentin osalta 100%. Näiden prosenttiosuuksien keskiarvosta määritettiin kipukynnys. Testit tehtiin affektiivis-motivatiivisen kivun testauksen yhteydessä ennen testiaineen antoa ja annon jälkeen, siten että kipukynnykset määritettiin välittömästi sen jälkeen kun eläin oli ollut 30 minuuttia isommassa muovilaatikossa affektiivis-motivatiivisen kivun testauksessa. Dorsaalisen striatumin kohdalla ei kipukynnysmäärittäystä suoritettu, sillä siitä oli jo julkaistua tietoa(25).

Koska rostroventraalinen medulla (RVM) on keskeinen aivorungosta lähtevien laskevien kipuratojen lähtökohta(2), niin oli tarpeellista tutkia elektrofysiologisilla menetelmillä *accumbens* tumakkeen dopaminergisen neurotransmission vaikutusta RVM:n neuronien toimintaan. Dorsaalisen striatumin dopaminergisen neurotransmission tiedettiin jo lisäävän kipua inhiboivien OFF-solujen toimintaa ja estävän kipua fasilitoivien ON-solujen toimintaa(25). Elektrofysiologiset rekisteröintejä tehtäessä oli SNI:n tekemisestä kulunut 6-8 viikkoa. Ennen rekisteröintien aloittamista rotat nukutettiin natriumpentobarbitaalilla i.p. annoksella 60 mg/kg, jonka jälkeen rotat asetettiin stereotaksiseen laitteeseen. Stereotaksisessa laitteessa ollessaan rottien kalloluuhun porattiin reikä, jonka kautta saatiin asetettua mikroelektrodi (impedanssi 5-7 MOhm 1 kHz:n taajudella) RVM:aan (AP: -2,3 mm, ML: 0,0 mm, DV: 7,8-9,8 mm). Anestesiaa pidettiin yllä toistuvilla natriumpentobarbitaali-infusioilla i.p. 15-20 mg/kg/h. Mikroelektrodin rekisteröimä informaatio vahvistettiin, suodatettiin ja siirrettiin luettavaan muotoon käyttäen Spike 2 ohjelmaa (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Ennen kuin tutkittavaa ainetta annosteltiin *accumbens* tumakkeeseen oli määritettävä se, oliko rekisteröinnin kohteena oleva neuron ON, OFF vai neutraali-neuron(59). Tämä tapahtui siten, että rekisteröitäessä neuronin rotan häntää nipistettiin ja tutkittiin rekisteröinnin kohteena olevan neuronin sähköisen aktiviteetin muutosta kipuärsykkeeseen. ON-soluiksi määriteltiin ne neuronit,

joiden aktiivisuus lisääntyi vähintään 15% perustasoon nähden ja OFF-soluiksi vastaavasti ne neuronit, joiden aktiivisuus väheni yli 15%, muut olivat neutraaleja soluja. Tässä tutkimuksessa keskityttiin rekisteröimään ainoastaan ON-soluja. Kun neuroni oli tunnistettu ON-soluksi, mitattiin neuronin spontaania aktiivisuutta kolmen minuutin ajan, jonka jälkeen tutkittavaa ainetta injisoitiin accumbens tumakkeeseen hitaasti n. 30 sekuntia kestäväällä injektioilla. ON-solun sähköistä aktiivisuutta mitattiin injektion jälkeen aikapisteissä 3, 5, 15 ja 30 minuuttia, kunkin aikapisteen kohdalla aktiivisuutta seurattiin minuutin ajan.

Testiaineina käytettiin selektiivistä dopamiini D2 reseptorien agonistia, (\pm) quinpirolea (Sigma-Aldrich Co. St. Louis MO, USA). Kontrolliaineena käytettiin salinia eli fysiologista keittosuolaa.

Tilastollinen analyysi perustui yksi- tai kaksisuuntaiseen vaihtelun analyysiin (ANOVA) sekä t-testiin. Tulokset on esitetty keskiarvona sekä (SEM). P-arvoa $< 0,05$ pidettiin tilastollisesti merkitseväenä.

4 Tulokset

Jotta eläimillä olisi kyetty suorittamaan kaikki suunnitellut tutkimukset, niin ehdoton edellytys oli neuropaattisen kivun kehittyminen. Neuropaattisen kivun kehittyminen todettiin kipukynnyksen herkkyyssmäärityksillä edellä mainitulla tavalla. Tulokset osoittavat selkeästi sen, että vaurioitettun jalan kipukynnys laski huomattavasti vaurioitumattomaan jalkaan nähden, eli rotille todella kehittyi hermovaurion aiheuttama neuropaattinen kipu. Kuvaajassa 100% edustaa kipuvastetta jokaiselle ärsykkeelle ja vastaavasti 0% tilannetta ilman yhtäkään vastetta ärsykkeelle. Ryhmien A (operoitu raaja, $n=12$) ja B (operoimaton raaja, $n=12$) välillä on merkittävä ero kipuvasteiden suhteen (Kuva 2, p-arvo 0,0044).

Ventraalisen striatumin D2 reseptorien aktivaatiolla ei tulosten ollut juurikaan merkitystä neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen kivun säätelyssä verrattuna kontrolliaineena käytettyyn fysiologiseen keittosuolaliuokseen. Tässäkin kuvaajassa tulos 100% edustaa kipuvastetta jokaiselle ärsykkeelle ja 0% tilannetta ilman yhtäkään kipuvastetta. Tulosten mukaan ryhmien A (fysiologinen keittosuolaliuos) ja B (quinpirole 10 μg) välillä ei ole merkittävää eroa kipuvasteessa mekaaniselle ärsykkeelle (Kuva 3, p-arvo 0,4732).

Kun neuropaattisen kivun kehittyminen oli kyetty osoittamaan, niin voitiin siirtyä testaamaan kivun affektiivis-motivationalista komponenttia. Ensinnäkin on tärkeä huomata, että testausmenetelmän(56) idea perustuu siihen, että rotta on taipuvainen hakeutumaan mieluummin pimeälle puolelle kuin valoisaa osaan. Tulokset osoittavat hyvin sen, että 30 minuutin aikana eläimet olivat taipuvaisia viettämään aikaa enemmän pimeässä kuin valoisassa. Ennen testiaineen antoa ja ilman kipustimulaatiota eläimet viettivät valoisalla puolella vain 8,3% -14,4% kokonaisajasta (30 min). Kun verrataan valoisalla puolella vietettyä aikaa ennen ja jälkeen testiaineen antoa ja kipustimulaatiota, niin havaitaan, että kipustimulaatio vaikutti huomattavasti eläinten käyttäytymiseen (Kuva 4, p-arvo kummassakin ryhmässä $< 0,001$).

Ventraalisen striatumin D2 reseptorien aktivaatio ei vaikuttanut merkittävästi neuropaattiseen affektiivis-motivationaliseen kipuun. 30 minuutin testijakson aikana ei quinpirolen ja kontrolloiaineena käytetyn fysiologisen keittosuolaliuoksen välillä esiintynyt tuloksellisesti merkittäviä eroja yhdessä mitatussa aikapisteessä (Kuva 5a, p-arvo kaikissa $> 0,05$).

Dorsaalisen striatumin D2 reseptoreilla oli affektiivis-motivationalista kipua lievittävä vaikutus kontrolloiaineena käytettyyn fysiologiseen keittosuolaliuokseen verrattuna. Dorsaalisen striatumin D2 reseptorien kipua lievittävä vaikutus tuli 30 minuutin aikana loppua kohden yhä merkittävämmäksi. Tuloksellisesti merkittäviä eroja tuli esiin kolmen viimeisen aikapisteen kohdalla (Kuva 5b, 20 min: p-arvo $< 0,05$; 25 min p-arvo $< 0,01$; 30 min p-arvo $< 0,001$).

Kun neuropaattisen kivun eri komponentteihin liittyvät tutkimukset saatiin päätökseen, niin eläimille tehtiin vielä RVM:sta elektrofysiologisia solurekisteröintejä ventraalisen striatumin accumbens tumakkeesta. Tulosten mukaan ventraalisen striatumin D2 reseptorien aktivaatiolla ei ollut tuloksellisesti merkittävää eroa saliiniin nähden 30 minuuttia (ON-solua kohden) kestäneen rekisteröinnin aikana. Nämä tulokset ovat samassa linjassa yllä mainittujen, sensoris-diskriminatiivista ja affektiivis-motivationalista kipua mittaavien tulosten kanssa (Kuva 6, $n=3$).

Aivoista leikatuista, histologisesti värjätystä mikroleikkeistä voitiin todeta kanyylin ja rekisteröintielektrodin olleen halutuissa paikoissa (Kuva 7a, 7b ja 7c).

5 Pohdinta

Tulokset osoittavat sen, että ventraalisen striatumiin kuuluvan accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaatio ei vaikuttanut merkittävästi neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen kivun säätelyyn verrattuna kontrolliaineena käytettyyn keittosuolaliuokseen. Myöskään neuropaattisen kivun affektiivis-motivationaleen komponenttiin ei accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimuloinnilla tullut ilmi merkittäviä eroja keittosuolakontrolliin nähden. Sen sijaan hieman yllättäen, esittämäämme hypoteesia ajatellen, dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaatio aiheutti voimakkaan neuropaattisen affektiivis-motivationaleen kivun lieventymisen.

Hypotesimme mukaan limbiseen järjestelmään kuuluva accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulointi vaikuttaisi enemmän neuropaattiseen affektiivis-motivationaleen kuin sensoris-diskriminatiiviseen kipuun. Kuitenkin osoittautui, että D2 reseptorien stimulaatio ei vaikuttanut merkittävästi kumpaankaan neuropaattisen kivun komponenttiin. Tuloksemme eivät ole siis lainkaan samassa linjassa aiempien tutkimustulosten kanssa, jotka ovat osoittaneet accumbens-tumakkeen dopaamiinin ja D2 reseptorien aiheuttavan analgesiaa ja vähentävään kipuun liittyviä behavioraalisia muutoksia(39,40,47,54). Taylor ym. osoittivat accumbens tumakkeen D2 reseptorien lievittävän inflammatorista kipua(47). Niin ikään N2O:n inflammatorista kipua lievittävän vaikutuksen on osoitettu ainakin osittain välittyvän accumbens tumakkeen D2 reseptorien välityksellä(54). Altier ym. ovat osoittaneet, että VTA:n dopaminergisten neuronien stimulaatio johtaa dopaamiinin vapautumiseen accumbens tumakkeeseen, mikä lievittää formaalinilla aikaan saatua inflammatorista kipua(39,40). Eräs tärkeimmistä eroista meidän tulosten ja yllämainittujen aiempien tulosten välillä on epäilemättä muutos neuropatian aiheuttamassa kroonisessa kivussa ja toisaalta formaalinilla aikaan saadussa inflammatorisessa toonisessa kivussa. On todennäköistä, että neuropatian seurauksena tapahtuu keskushermostossa erilaisia muutoksia kuin formaaliinin aiheuttamassa inflammaatiassa. Eräs mielenkiintoinen havainto on se, että neuropatian seurauksena dopamiinin vapautuminen accumbens tumakkeeseen vähenee ja yhtenä mahdollisena syynä tähän on esitetty VTA:n μ -opioidireseptorien aktiivisuuden vähenemistä(49,60). Ozakin ym.(60) ja Niikuran ym.(49) havainnot yhdistettynä Altierin ym.(39,40) havaintoihin voisivat kertoa siitä, että opioidien vaikutukset VTA:ssa muuttumisen neuropatian seurauksena, mikä edelleen voisi selittää kipuinformaation säätelyreittien muuttumista neuropatian seurauksena. Tätä ajatusta tukee myös havainto, jonka mukaan opioidien palkitsemistoimintoihin liittyvät vaikutukset vähenenevät neuropaattisilla rotilla VTA:ssa tapahtuvien molekulaaristen muutosten seurauksena(51). Edelleen mielenkiintoinen tutkimustulos on myös se, että rostraalinen agranulaarinen insulaarinen korteksi (RAIC) on mahdollisesti osallisena kivun affektiivis-motivationaleen komponentin säätelyssä GABAergisten neuronien välityksellä ja näiden neuronien toimintaan vaikuttavien dopaminergisten neuronien lähtökohdat ovat ennen kaikkea VTA:ssa, mutta myös

substantia nigra (SN) (61). Koska näyttää siltä, että μ -opioidireseptorit ovat keskeisessä asemassa VTA:n dopaminergisten neuronien toiminnan kannalta ja koska neuropatiasta kärsivillä rotilla näiden reseptorien aktiivisuus on vähentynyt (49,60), niin on ilmeistä, että Oharan ym. havainnot (61) tukevat niin meidän kuin myös Ozakin ym. (60) ja Niikuran ym. (49) havaintoja. Toinen mielenkiintoinen näkökulma perustuu havaintoon, jonka mukaan kivulias ärsyke aiheuttaa VTA:n dopaminergisten solujen inhibition (45). Tämä tulos on periaatteessa ristiriidassa Altierin ym. tulosten kanssa, mutta on ehdottomasti otettava huomioon myös se seikka, että Unglessin ym. havainnot (45) perustuvat akuutin kipuärsyksen (jalan nipistys) aiheuttamiin muutoksiin kun taas Altierin ym. havainnot (39,40) perustuvat (39) formaalin aikaansaaman toonisen kivun aiheuttamiin muutoksiin. Tutkimuksissa, jossa accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaatiolla havaittiin inflammatorista kipua lievittävä vaikutus, annettiin D2 agonistia bilateraalisesti (47). Meidän tutkimuksessa D2 agonistia annosteltiin ainoastaan ipsilateraalisesti vaurioitettuun jalkaan nähden. Lisäksi meidän tutkimuksessa käytettiin huomattavasti suurempaa annosta. Nämä tekijät voisivat olla huomion arvoisia verrattaessa havaintoja keskenään. Huomioimatta ei tule jättää myöskään sitä seikkaa, että kipun liittyvän aversiokäyttäytymisen ja affektiivis-motivationalisen komponentin tutkiminen on äärimmäisen haastavaa. Jotta tuloksia pystyttäisiin luotettavammin ja paremmin vertailemaan keskenään, niin toivottavaa olisikin pyrkiä yhdenmukaistamaan testimenetelmiä. Toisaalta nykyisetkään aversiokäyttäytymisessä käytettävät mallit eivät ole missään nimessä täydellisiä, joten tästä näkökulmasta ajatellen on ehdottoman tärkeää, että uusien menetelmien kehitys jatkuu.

Saamiemme tulosten mukaan accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulointi ei siis vaikuttanut neuropaattisen sensoris-diskriminatiivisen kivun säätelyyn saliniin verrattuna. Löydöksiämme tukevat myös RVM:n elektrofysiologiset mittaukset, joiden mukaan accumbens tumakkeen D2 stimulaatio ei aiheuttanut RVM:n ON-solujen sähköisessä toiminnassa muutoksia kontrolliaineeseen verrattuna. Kuten edellä on jo useaan kertaan mainittu, on accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaation havaittu lievittävän formaalinilla aiheutettua toonista kipua. Näissä testeissä on kuitenkin seurattu kipun liittyvää behavioraalista käyttäytymistä usean kymmenen minuutin ajan, mikä ei välttämättä ole verrattavissa lyhytaikaisen mekaanisen ärsyksen tuottamaan kipun. Meidän tuloksia tukevat vahvasti Ozakin ym. (48), Niikuran ym. (49) ja Naritan ym. (51) havainnot neuropatian aiheuttamista muutoksista VTA:n μ -opioidi reseptorien toiminnassa. Myöskin se havainto, että nosiseptiivinen ärsyke inhiboi VTA:n dopaminergisia neuroneja tukee havaintojamme, mutta on otettava huomioon se, että ko. tutkimuksessa (45) ei koe-eläimillä ollut neuropatiaa.

Dorsaalisen striatumin dopamiini D2 reseptorien merkitys kivun sensoris-diskriminatiivisen komponentin säätelyssä on osoitettu niin neuropaattisen kuin nosiseptiivisenkin kivun kohdalla (20,25,31). Meidän

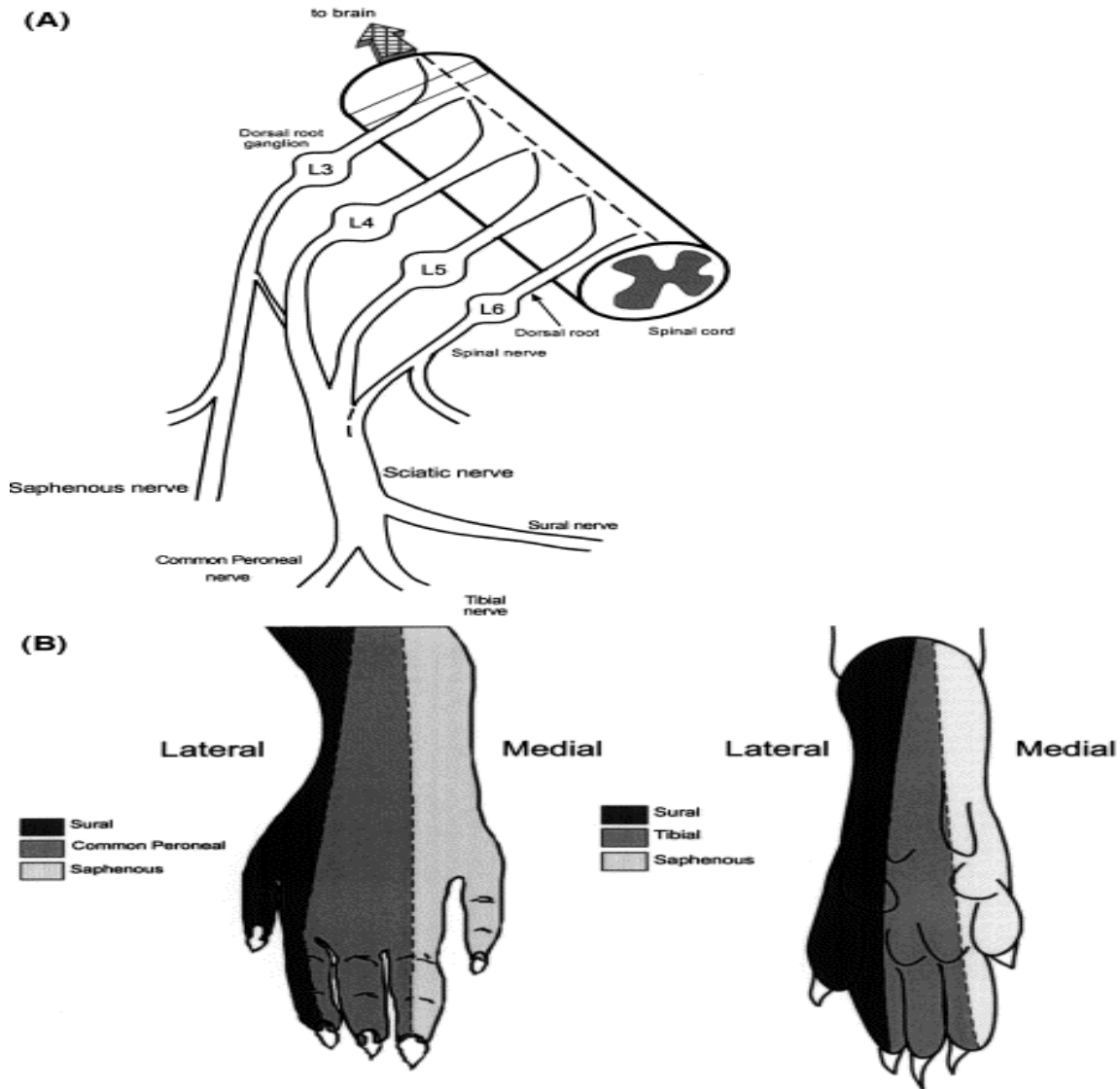
hypoteesimme oli se, että pikemminkin accumbens tumake kuin dorsaalinen striatum olisi tärkeässä osassa neuropaattisen kivun affektiivis-motivationalaisen komponentin säätelyssä, mutta tämä oletus osoittautui vääräksi. Meidän tulokset osoittavat selkeästi, että dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaatio lievittää neuropaattista affektiivis-motivationalista kipua, mikä on linjassa sen kanssa, että dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaatio lievittää formaalinilla aikaan saatua inflammatoriseen kipuun liittyvää aversiokäyttäymistä(62). On kuitenkin muistettava, että perifeerisen hermovaurion aiheuttama neuropaattinen kipu on eri asia kuin formaaliinilla aikaansaatu inflammatorinen kipu, joten taustalla olevat mekanismit eivät välttämättä ole lainkaan yhtenevät keskenään. Eräs potentiaalinen selitysmalli olisi varmasti se, että affektiivis-motivationalista kipua käsittelevät aivoalueet lieventävät kipua mekanismeilla, joka on ainakin osittain riippuvainen dorsaalisisessa striatumissa tapahtuvasta D2 välitteisestä dopaminergisestä tiedonvälityksestä. Vaikeampi kysymys on sitten se, että kuinka tämä voisi tapahtua?

Anterioriseen cingulaarikorteksiin (ACC) kohdistetut vauriot näyttäisivät vaikuttavan neuropaattiseen affektiivis-motivationalaiseen kipuun (63). ACC:sta on lukuisia yhteyksiä muille aivoalueille, myös dorsaaliseen striatumiin (64). Niinpä ACC:n merkitys neuropaattisen kivun affektiivis-motivationalaisen komponentin säätelyssä yhdistettynä siihen havaintoon, että ACC:sta on yhteyksiä dorsaaliseen striatumiin voisi tarjota yhden mahdollisen selitysmallin meidän tuloksille. Limbiseen järjestelmään kuuluvan mantelitumakkeen eli amygdalan GABA-A reseptorien on osoitettu osallistuvan neuropaattisen kivun, ennen kaikkea sen affektiivis-motivationalaisen komponentin säätelyyn(65). Myös amygdalasta on yhteyksiä dorsaalisen striatumiin dorsaaliseen striatumiin (66), joten tässä voisi olla myös eräs näkökulma, joka kannattaa ottaa huomioon tulostemme tulkinnessa. Mielenkiintoista on myös se, että amygdalaan injisoitu morfiini aiheuttaa RVM:n neuroneissa ON-solujen inhibition ja OFF-solujen aktivaation lieventäen näin akuuttia nosiseptiivista kipua (67). Vastaavanlainen RVM:n solujen toiminta on havaittu myös silloin, kun perifeerisestä neuropatiasta kärsivän rotan dorsaalisen striatumin D2 reseptoreita stimuloidaan (25). Ongelma näitä tuloksia verratessa on jälleen siinä, että akuutin nosiseptiivisen kivun säätelyn mekanismit eivät ole välttämättä lainkaan samoja kuin neuropaattisen kivun säätelyyn osallistuvat mekanismit. Eräs mainitsemisen arvoisista havainnoista meidän tulosten kannalta on se, että orbitofrontaalinen korteksi osallistuu neuropaattisen kivun säätelyyn (68,69). Lisäksi se, että orbitofrontaaliselta korteksilta, erityisesti sen ventrolateraalisisesta osasta, on yhteyksiä ennen kaikkea caudatus-putamen alueelle eikä niinkään accumbens tumakkeeseen (70). Tämä voisi osaltaan selittää sen, miksi dorsaalisen striatumin D2 reseptorien stimulaatio lievensi neuropaattista kipua, mutta accumbens tumakkeen D2 stimulaatiolla ei ollut vaikutusta neuropaattisen kivun säätelyyn.

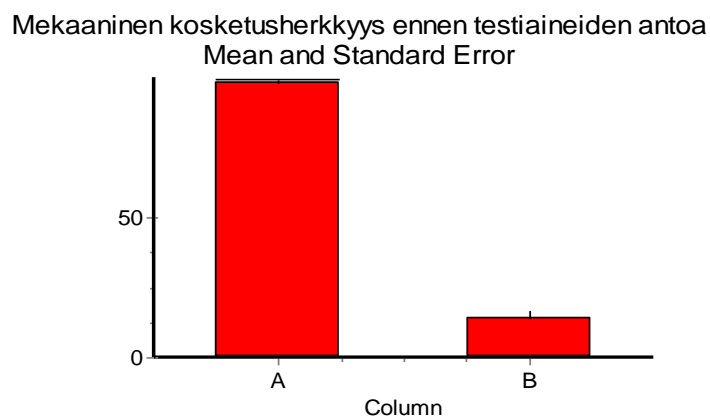
6 Johtopäätökset

Niikura ym. sekä Narita ym. ovat osoittaneet neuropatian aiheuttavan VTA:n dopaminergisissa soluissa toimintamuutoksia, joiden he ovat arvioineet selittävän ainakin osittain opioidien huonoa tehoa neuropaattisen kivun hoidossa (49,71). Meidän tulokset vahvistavat näitä havaintoja. Lisäksi meidän tulokset tuovat myös esiin sen, että vaikka neuropatia aiheuttaa VTA:n accumbens tumakkeiden toimintamuutoksen, niin accumbens tumakkeen eksogeeninen D2 reseptorien aktivaatio ei palauta kipuinhibitiota. Tämä voisi puolestaan tarkoittaa sitä, että neuropatia muuttaa kivun säätelyreittejä niin, että accumbens tumakkeen D2 reseptoreilla ei olisikaan merkitystä kivun säätelyssä, toisin kuin inflammatorisen kivun säätelyssä (39,40,55). Huomattavasti vaikeampaa on tehdä selkeitä johtopäätöksiä dorsaalisen striatumin D2 reseptorien ominaisuudesta lievittää neuropaattista affektiivis-motivatiionaalista kipua. Ainakin aluksi tulisi selvittää dorsaalisen striatumin D2 reseptorien aktivaation vaikutus ei-neuropaattisen kivun affektiivis-motivatiionaalisen kivun säätelyyn. Selvää on kuitenkin se, että tietyt aivoalueet, joista on yhteyksiä dorsaaliseen striatumiin, osallistuvat neuropaattisen affektiivis-motivatiionaalisen kivun säätelyyn. Niinpä voisi olla tärkeää tutkia näiden alueiden ja dorsaalisen striatumin välisiä potentiaalisia yhteyksiä tarkemmin neuropaattisen kivun inhibitiossa. Toivottavasti tulevaisuudessa saamme vastauksia sekä parempia ja kattavampia selitysmalleja neuropaattisen kivun säätelymekanismeista, parhaimmassa tapauksessa jopa tehokkaampaa neuropaattisen kivun lievitystä.

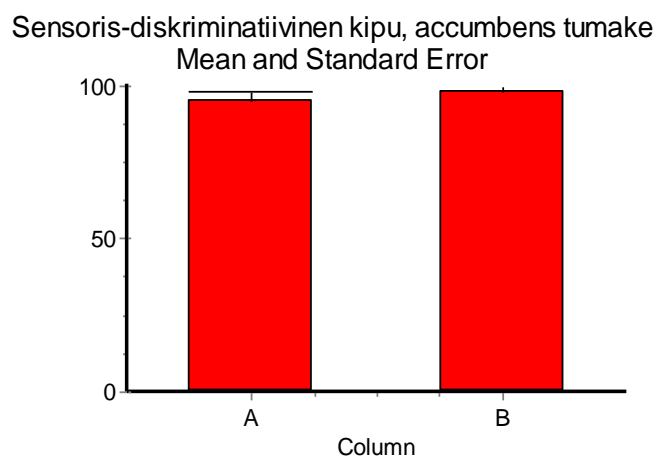
7 Kuvat ja kuvaajat



Kuva 1. A: N. ischiadicuksen ja n. saphenouksen lähtökohdat plexus femoraliksesta. B: N. ischiadicuksen päätehaarojen hermotusalueet jalkaterässä. (57)

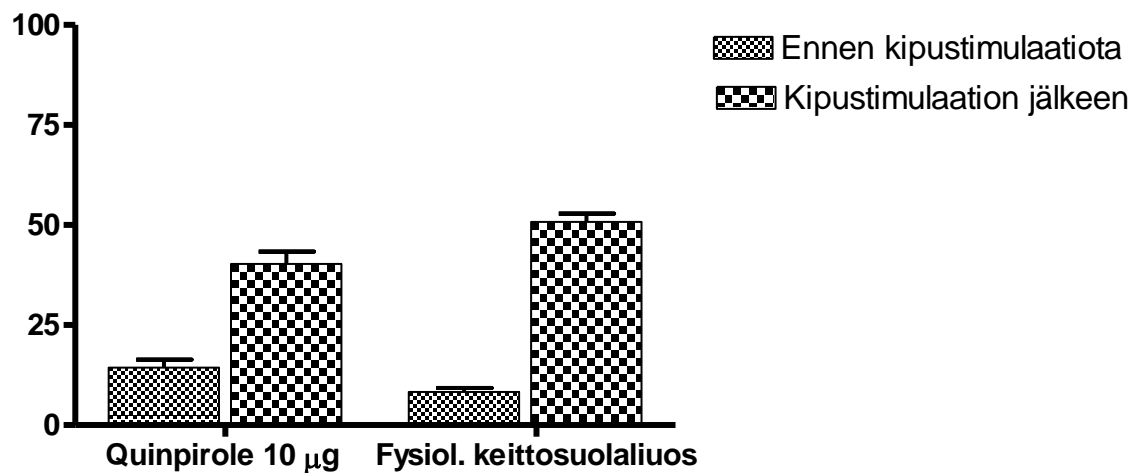


Kuva 2. A: operoitu raaja. B: operoimaton raaja. Keskiarvo ja SEM, n=12, p-arvo 0,0044



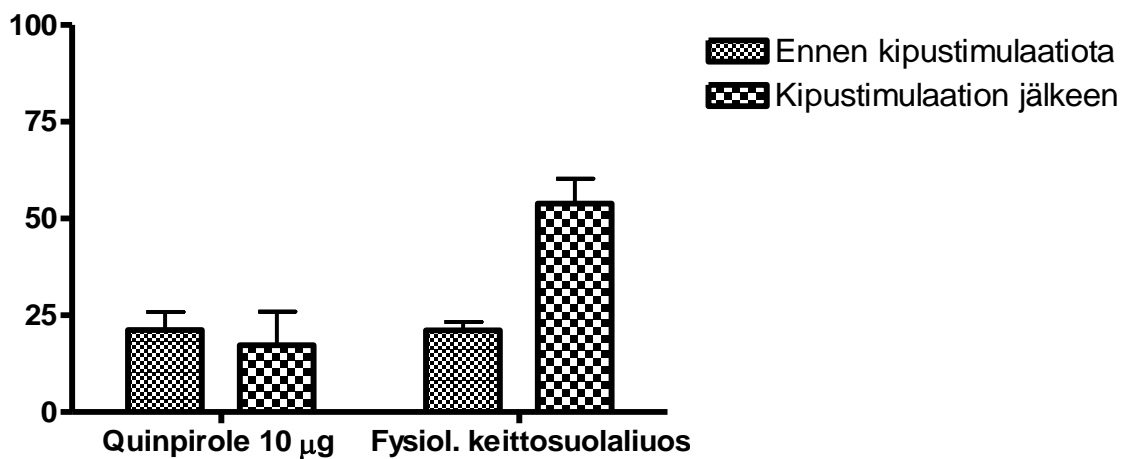
Kuva 3. A: fysiologinen keittosuolaliuos. B: quinpirole 10 µg. Keskiarvo ja SEM, n=4 (A ja B), P-arvo 0,4732.

Valoisalla puolella vietetyt ajat (%), accumbens tumake



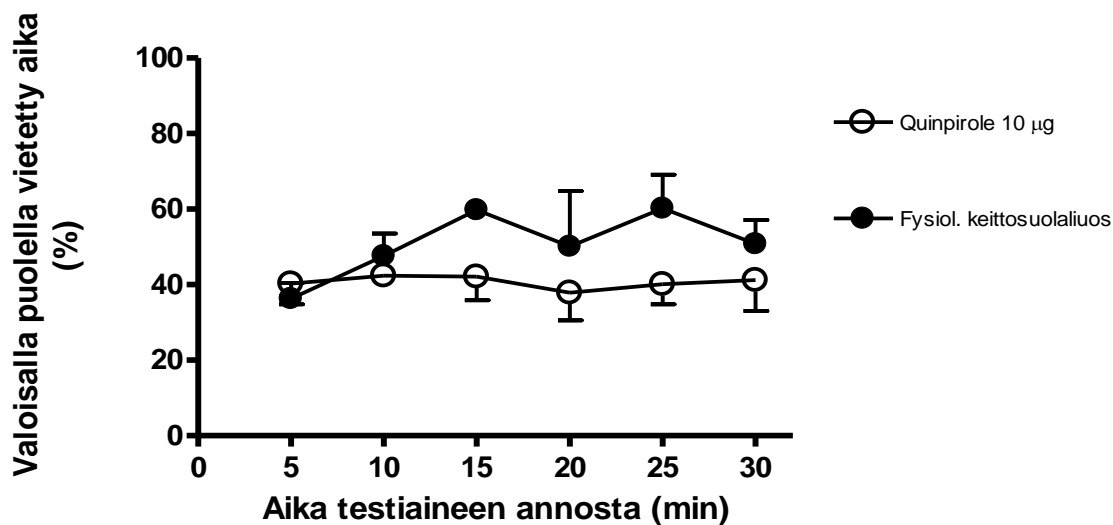
Kuva 4a. Kipustimulaatioon käytetty voima F=180 g. SEM, n=4 (molemmat ryhmät).

Valoisalla puolella vietetyt ajat (%), dorsaalinen striatum



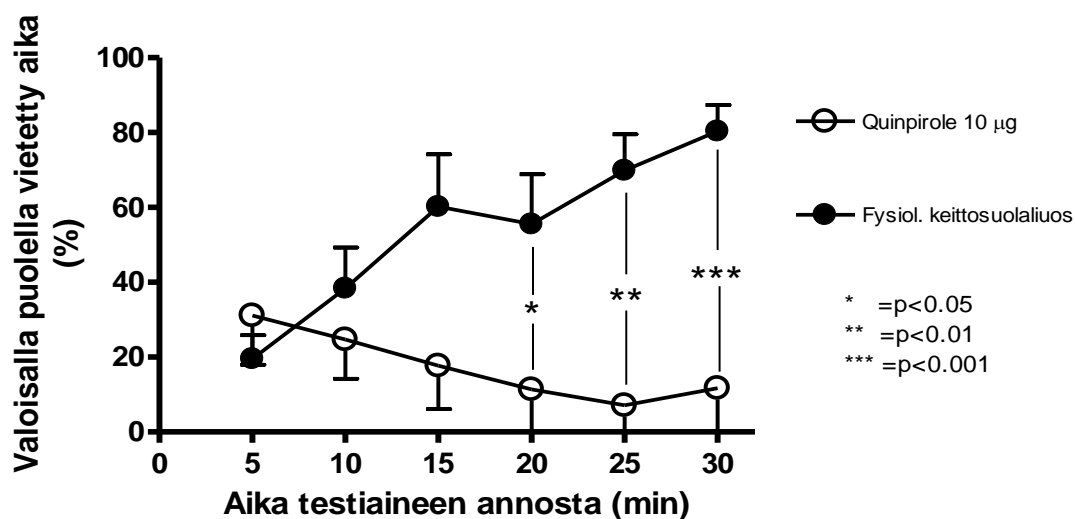
Kuva 4b. Kipustimulaatioon käytetty voima F=60 g. Keskiarvo ja SEM, n=5 (quinpirole 10 µg), n=8 (fysiol. keittosuolaliuos).

Quinpirole vs. fysiologinen keittosuolaliuos, accumbens tumake

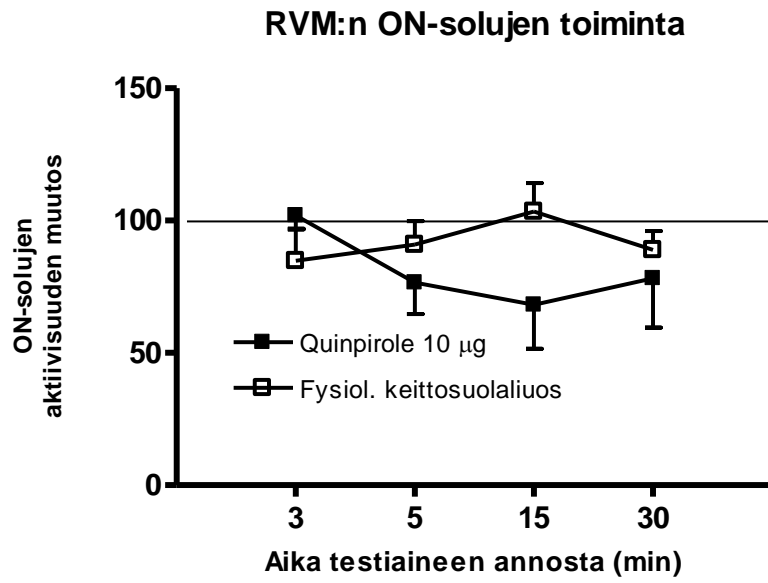


Kuva 5a. Accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaation vaikutus affektiivis-motivationaleen kipuun. Kipustimulaatioon käytetty voima F=180 g. Keskiarvo ja SEM, n=4.

Quinpirole vs. fysiologinen keittosuolaliuos, dorsaalinen striatum



Kuva 5b. Dorsaalisen striatum D2 reseptorien stimulaation vaikutus affektiivis-motivationaleen kipuun. Kipustimulaatioon käytetty voima F=60 g. Keskiarvo ja SEM, n=5 (quinpirole 10 µg), n=8 (fysiol. keittosuolaliuos).



Kuva 6. Accumbens tumakkeen D2 reseptorien stimulaation vaikutus RVM:n ON-solujen toimintaan, n=3.

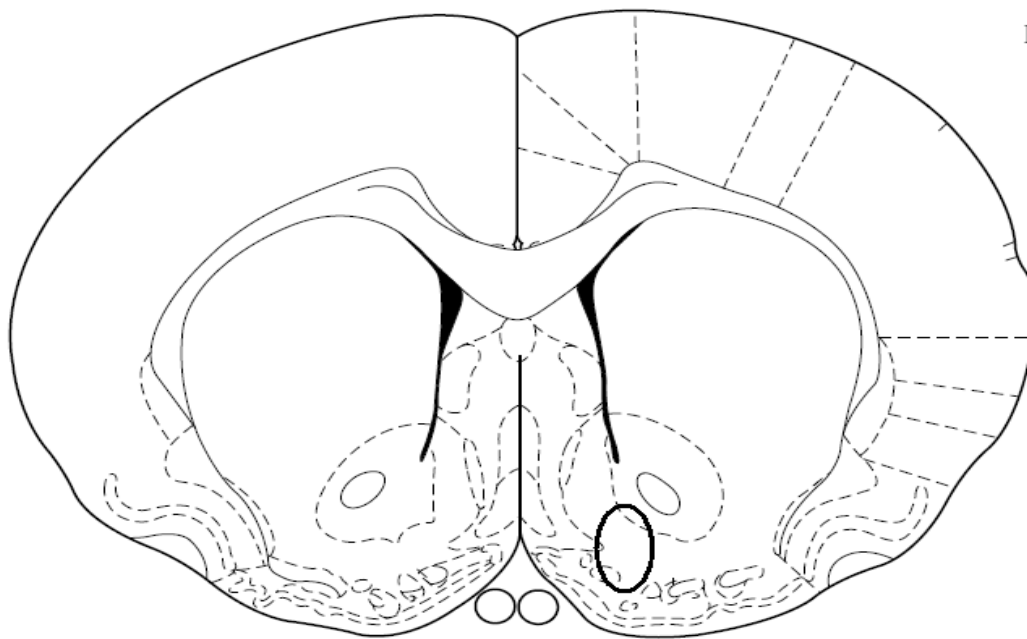
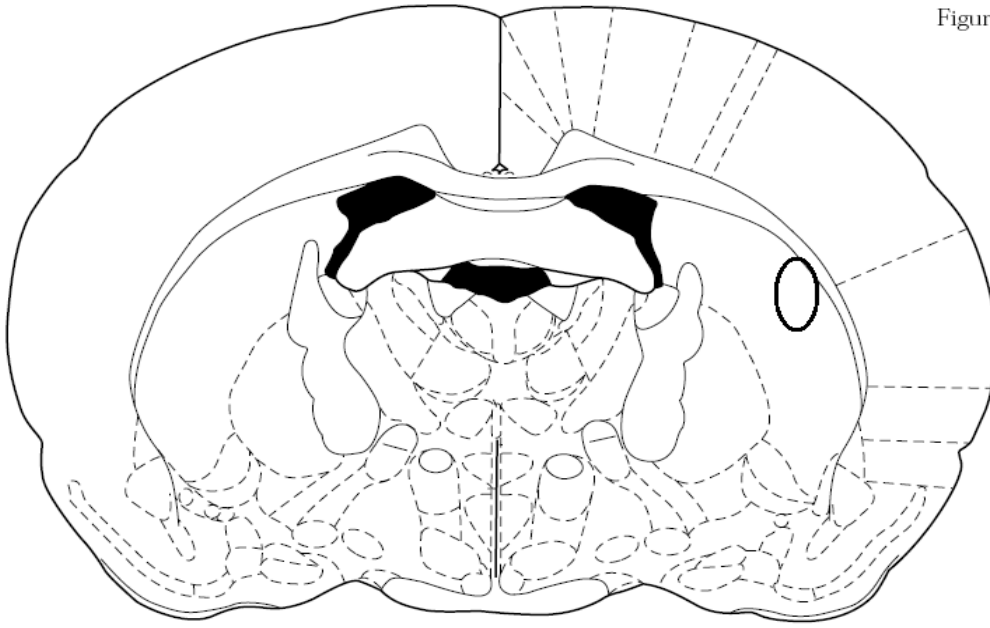


Figure 14

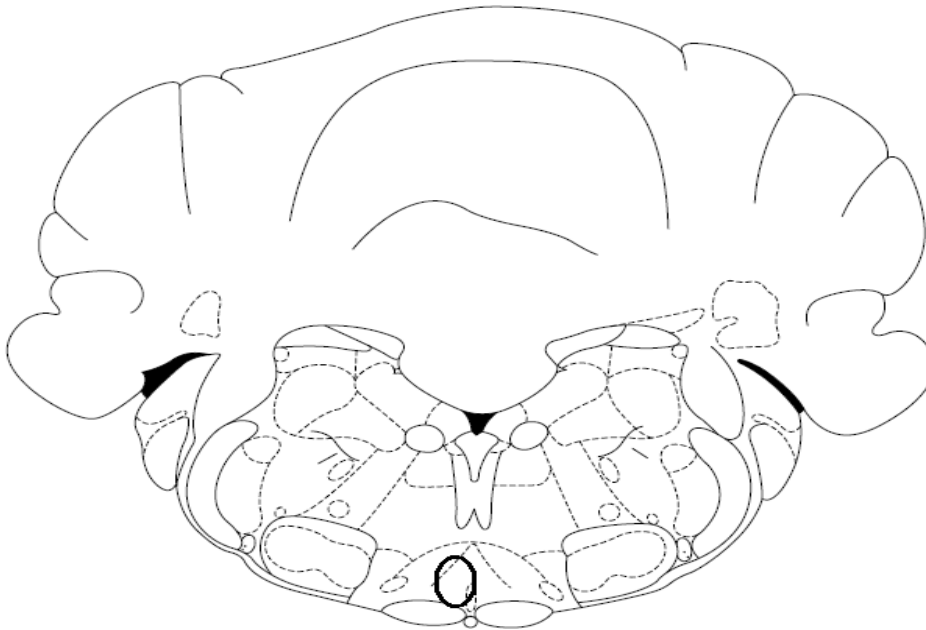
Kuva 7a. Kanyylien sijainti accumbens tumakkeessa, n=4.

Figure 23



Kuva 7b. Kanyylien sijainti dorsaalissa striatumissa, n=8.

Figure 63



Kuva 7c. Elektrodien sijainti RVM:ssä,

8 Viitteet

- (1) Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965 Nov 19;150(699):971-979.
- (2) Millan MJ. Descending control of pain. *Prog.Neurobiol.* 2002 Apr;66(6):355-474.
- (3) Pertovaara A. Plasticity in descending pain modulatory systems. *Prog.Brain Res.* 2000;129:231-242.
- (4) Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet* 1999 May 8;353(9164):1610-1615.
- (5) Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J.Clin.Neurophysiol.* 1997 Jan;14(1):2-31.
- (6) Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.see comment. *Lancet* 1999 Jun 5;353(9168):1959-1964.
- (7) Devor M. Wall and Melzack's Textbook of Pain. 5th ed. China: Elsevier; 2006. p. 905-927.
- (8) Basso MA, Powers AS, Evinger C. An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. I. Superior colliculus. *J.Neurosci.* 1996 Nov 15;16(22):7308-7317.
- (9) Basso MA, Evinger C. An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. II. Nucleus raphe magnus. *J.Neurosci.* 1996 Nov 15;16(22):7318-7330.
- (10) Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert rev.neurotherapeutics* 2008 May;8(5):781-797.
- (11) Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 1991;41(1):1-24.
- (12) West AR, Floresco SB, Charara A, Rosenkranz JA, Grace AA. Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003 Nov;1003:53-74.
- (13) Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol.Rev.* 1999 Dec;51(4):593-628.
- (14) Chudler EH, Dong WK. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain* 1995 Jan;60(1):3-38.
- (15) Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 2003 Feb 21;299(5610):1240-1243.

- (16) Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum.Mol.Genet.* 2005 Jan 1;14(1):135-143.
- (17) Wood PB. Mesolimbic dopaminergic mechanisms and pain control. *Pain* 2006 Feb;120(3):230-234.
- (18) Gear RW, Aley KO, Levine JD. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J.Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):7175-7181.
- (19) Franklin KB. Analgesia and the neural substrate of reward. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1989 Summer-Fall;13(2-3):149-154.
- (20) Lin MT, Wu JJ, Chandra A, Tsay BL. Activation of striatal dopamine receptors induces pain inhibition in rats. *J.Neural Transm.Gen.Sect.* 1981;51(3-4):213-222.
- (21) Belforte JE, Pazo JH. Striatal inhibition of nociceptive responses evoked in trigeminal sensory neurons by tooth pulp stimulation. *J.Neurophysiol.* 2005 Mar;93(3):1730-1741.
- (22) Hagelberg N, Jaaskelainen SK, Martikainen IK, Mansikka H, Forssell H, Scheinin H, et al. Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. *Eur.J.Pharmacol.* 2004 Oct 1;500(1-3):187-192.
- (23) Scott DJ, Heitzeg MM, Koeppe RA, Stohler CS, Zubietta JK. Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity. *J.Neurosci.* 2006 Oct 18;26(42):10789-10795.
- (24) Magnusson JE, Fisher K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res.* 2000 Feb 14;855(2):260-266.
- (25) Ansah OB, Leite-Almeida H, Wei H, Pertovaara A. Striatal dopamine D2 receptors attenuate neuropathic hypersensitivity in the rat. *Exp.Neurol.* 2007 Jun;205(2):536-546.
- (26) Chudler EH, Sugiyama K, Dong WK. Nociceptive responses in the neostriatum and globus pallidus of the anesthetized rat. *J.Neurophysiol.* 1993 Jun;69(6):1890-1903.
- (27) Chudler EH. Response properties of neurons in the caudate-putamen and globus pallidus to noxious and non-noxious thermal stimulation in anesthetized rats. *Brain Res.* 1998 Nov 23;812(1-2):283-288.
- (28) Schultz W, Romo R. Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *J.Neurophysiol.* 1987 Jan;57(1):201-217.
- (29) Carey RJ. Acute ipsilateral hyperalgesia and chronic contralateral hypoalgesia after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. *Exp.Neurol.* 1986 Feb;91(2):277-284.
- (30) Saade NE, Atweh SF, Bahuth NB, Jabbur SJ. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res.* 1997 Mar 14;751(1):1-12.

- (31) Takeda R, Ikeda T, Tsuda F, Abe H, Hashiguchi H, Ishida Y, et al. Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. *Neurosci.Res.* 2005 May;52(1):31-36.
- (32) Ford B. Pain in Parkinson's disease. *Clin.Neurosci.* 1998;5(2):63-72.
- (33) Hagelberg N, Forssell H, Rinne JO, Scheinin H, Taiminen T, Aalto S, et al. Striatal dopamine D1 and D2 receptors in burning mouth syndrome. *Pain* 2003 Jan;101(1-2):149-154.
- (34) Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr.Opin.Neurobiol.* 1996 Apr;6(2):228-236.
- (35) Becerra L, Breiter HC, Wise R, Gonzalez RG, Borsook D. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 2001 Dec 6;32(5):927-946.
- (36) Jensen J, McIntosh AR, Crawley AP, Mikulis DJ, Remington G, Kapur S. Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron* 2003 Dec 18;40(6):1251-1257.
- (37) Ma QP, Han JS. Naloxone blocks opioid peptide release in periaqueductal gray and amygdala elicited by morphine injected into N. accumbens. *Peptides* 1992 Mar-Apr;13(2):261-265.
- (38) Ma QP, Shi YS, Han JS. Further studies on interactions between periaqueductal gray, nucleus accumbens and habenula in antinociception. *Brain Res.* 1992 Jun 26;583(1-2):292-295.
- (39) Altier N, Stewart J. Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998 Apr;285(1):208-215.
- (40) Altier N, Stewart J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci.* 1999;65(22):2269-2287.
- (41) Schmidt BL, Tambeli CH, Gear RW, Levine JD. Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience* 2001;106(1):129-136.
- (42) Aharon I, Becerra L, Chabris CF, Borsook D. Noxious heat induces fMRI activation in two anatomically distinct clusters within the nucleus accumbens. *Neurosci.Lett.* 2006 Jan 16;392(3):159-164.
- (43) Magnusson JE, Martin RV. Additional evidence for the involvement of the basal ganglia in formalin-induced nociception: the role of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 2002 Jun 28;942(1-2):128-132.
- (44) Schmidt BL, Tambeli CH, Barletta J, Luo L, Green P, Levine JD, et al. Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. *J.Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6773-6780.
- (45) Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP. Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* 2004 Mar 26;303(5666):2040-2042.

- (46) Clarke PB, Franklin KB. Infusions of 6-hydroxydopamine into the nucleus accumbens abolish the analgesic effect of amphetamine but not of morphine in the formalin test. *Brain Res.* 1992 May 15;580(1-2):106-110.
- (47) Taylor BK, Joshi C, Uppal H. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain Res.* 2003 Oct 17;987(2):135-143.
- (48) Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Sugita J, Matsumura Y, et al. Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: implication of the reduction in mu-opioid receptor functions in the ventral tegmental area. *J.Neurochem.* 2002 Sep;82(5):1192-1198.
- (49) Niikura K, Narita M, Narita M, Nakamura A, Okutsu D, Ozeki A, et al. Direct evidence for the involvement of endogenous beta-endorphin in the suppression of the morphine-induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state. *Neurosci.Lett.* 2008 Apr 25;435(3):257-262.
- (50) Piepponen TP, Ahtee L. Effects of selective opioid receptor antagonists on morphine-induced changes in striatal and limbic dopamine metabolism. *Pharmacol.Toxicol.* 1995 Sep;77(3):204-208.
- (51) Narita M, Suzuki M, Imai S, Narita M, Ozaki S, Kishimoto Y, et al. Molecular mechanism of changes in the morphine-induced pharmacological actions under chronic pain-like state: suppression of dopaminergic transmission in the brain. *Life Sci.* 2004 Apr 9;74(21):2655-2673.
- (52) Wiesendanger E, Clarke S, Kraftsik R, Tardif E. Topography of cortico-striatal connections in man: anatomical evidence for parallel organization. *Eur.J.Neurosci.* 2004 Oct;20(7):1915-1922.
- (53) Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H. Neural circuits and functional organization of the striatum. *J.Neurol.* 2000 Sep;247(Suppl 5):1-15.
- (54) Koyanagi S, Himukashi S, Mukaida K, Shichino T, Fukuda K. Dopamine D2-like receptor in the nucleus accumbens is involved in the antinociceptive effect of nitrous oxide. *Anesth.Analg.* 2008 Jun;106(6):1904-1909.
- (55) Taylor BK, Joshi C, Uppal H. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain Res.* 2003 Oct 17;987(2):135-143.
- (56) LaBuda CJ, Fuchs PN. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp.Neurol.* 2000 Jun;163(2):490-494.
- (57) Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000 Aug;87(2):149-158.
- (58) Donovan PJ. A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Technol.* 1974 Jan;49(1):49-51.
- (59) Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* 5th ed. China: Elsevier; 2006. p. 125-142.
- (60) Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Sugita J, Matsumura Y, et al. Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: implication of the reduction in

mu-opioid receptor functions in the ventral tegmental area. *J.Neurochem.* 2002 Sep;82(5):1192-1198.

(61) Ohara PT, Granato A, Moallem TM, Wang BR, Tillet Y, Jasmin L. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J.Neurocytol.* 2003 Feb;32(2):131-141.

(62) Magnusson JE, Fisher K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res.* 2000 Feb 14;855(2):260-266.

(63) LaGraize SC, Labuda CJ, Rutledge MA, Jackson RL, Fuchs PN. Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Exp.Neurol.* 2004 Jul;188(1):139-148.

(64) Kunishio K, Haber SN. Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J.Comp.Neurol.* 1994 Dec 15;350(3):337-356.

(65) Pedersen LH, Scheel-Kruger J, Blackburn-Munro G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain* 2007 Jan;127(1-2):17-26.

(66) McDonald AJ. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 1991;44(1):1-14.

(67) McGaraughty S, Heinricher MM. Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. *Pain* 2002 Mar;96(1-2):153-162.

(68) Baliki M, Al-Amin HA, Atweh SF, Jaber M, Hawwa N, Jabbur SJ, et al. Attenuation of neuropathic manifestations by local block of the activities of the ventrolateral orbito-frontal area in the rat. *Neuroscience* 2003;120(4):1093-1104.

(69) Al Amin HA, Atweh SF, Baki SA, Jabbur SJ, Saade NE. Continuous perfusion with morphine of the orbitofrontal cortex reduces allodynia and hyperalgesia in a rat model for mononeuropathy. *Neurosci.Lett.* 2004 Jun 24;364(1):27-31.

(70) Schilman EA, Uylings HB, Galis-de Graaf Y, Joel D, Groenewegen HJ. The orbital cortex in rats topographically projects to central parts of the caudate-putamen complex. *Neurosci.Lett.* 2008 Feb 13;432(1):40-45.

(71) Narita M, Suzuki M, Imai S, Narita M, Ozaki S, Kishimoto Y, et al. Molecular mechanism of changes in the morphine-induced pharmacological actions under chronic pain-like state: suppression of dopaminergic transmission in the brain. *Life Sci.* 2004 Apr 9;74(21):2655-2673.